

BEST AVAILABLE COPY

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 1989年3月10日

出 願 番 号
Application Number: 平成1年特許願第59183号

出 願 人
Applicant (s): 第一化学薬品株式会社
第一製薬株式会社
松 尾 壽 之



1990年3月23日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

吉田文毅



出証平 2-13799

特 許 願

平成元年 3 月 1 0 日

(14,000 円)

特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

1. 発明の名称

新規生理活性ペプチド及びその用途

2. 請求項の数 2

3. 発 明 者

居 所 東京都中央区日本橋三丁目 1 3 番 5 号

第一化学薬品株式会社内

氏 名 須 藤 哲 司

(ほか 3 名)

4. 特許出願人

住 所 東京都中央区日本橋三丁目 1 3 番 5 号

名 称 第一化学薬品株式会社

代表者 佐 藤 知 道

(ほか 2 名)

5. 代 理 人

住 所 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号 (〒103)

共同ビル 電話 (6 6 9) 0 9 0 4 番 (代)

氏 名 (6 8 7 0) 弁理士 有 賀 三 幸

(ほか 2 名)

6. 添付書類の目録

- | | |
|-----------|-------|
| (1) 明 細 書 | 1 通 |
| (2) 願書の副本 | 1 通 |
| (3) 委 任 状 | 各 1 通 |
| (4) 図 面 | 1 通 |

7. 前記以外の発明者、特許出願人および代理人

(1) 発 明 者

居 所 東京都墨田区業平 5 丁目 5 番 1 2 号
第一化学薬品株式会社 東京技術センター内

氏 名 泉 篤 志

居 所 東京都墨田区業平 5 丁目 5 番 1 2 号
第一化学薬品株式会社 東京技術センター内

氏 名 高 島 美 加

住 所 宮崎県宮崎郡清武町大字木原 6 6 5 3 番地

氏 名 松 尾 壽 之

(2) 特許出願人

住 所 東京都中央区日本橋三丁目 1 4 番 1 0 号

名 称 (2 8 3) 第一製薬株式会社

代表者 鈴 木 正

住 所 宮崎県宮崎郡清武町大字木原 6 6 5 3 番地

氏 名 松 尾 壽 之

(3) 代 理 人

住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 (〒103)
共同ビル 電話 (669) 0904番 (代)

氏 名 (7756) 弁理士 高 野 登志雄

住 所 同 上

氏 名 (9673) 弁理士 中 嶋 俊 夫

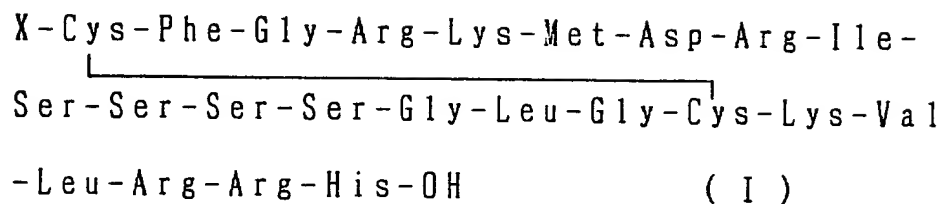
明 細 書

1. 発明の名称

新規生理活性ペプチド及びその用途

2. 特許請求の範囲

1 一般式 (I)



(式中、XはH、H-Gly-Ser-Gly-又はH-Ser-Pro-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly-を示す)
で表わされる生理活性ペプチドまたはその塩。

2 請求項1記載の生理活性ペプチドまたはその塩を含有する循環器系疾患治療剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は新規な生理活性ペプチド及びその用途に関し、更に詳細には、ヒト型脳性ナトリウム利尿ペプチド及びこれを含む高血圧症、浮腫性疾患、心不全、腎不全等の循環器系疾患治療剤に関する。

〔従来の技術〕

最近、ブタ脳からペプチドが単離、構造決定され、その構造及び生理活性作用が心房性ナトリウム利尿ペプチド（以下ANPと略す）とよく似ていることから、脳性ナトリウム利尿ペプチド（Brain Natriuretic Peptide；以下BNPと略す）と命名された〔須藤ら，Nature，332，78－80（1988）〕。BNPは生体の体液容量、電解質バランス及び血圧の調節に関与しており、これにより生体ではANPとBNPによる2重の調節機構が存在することが示された。

一方、このブタBNPのcDNAがクローニングされ、ブタBNPの前駆体の構造が明らかにされている

〔前川ら；Biochem. Biophys. Res. Commun., 157(1), 410～416（1988）〕。更にこのブタBNPのcDNAをプローブとしてヒトBNPのcDNAがクローニングされ、その構造解析によりヒトBNPのアミノ酸配列が推定されている。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしながら、ヒトBNPが単離もしくは合成さ

れた報告はなく、どのような作用或は活性を有しているのか不明である。従ってこのヒトBNPを合成し、その生物活性を公知のナトリウム利尿ペプチドと比較し、その有用性を探索することは、医薬品開発上、抗体産生等の副作用を回避する意味で重要である。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは、前記ヒトBNPのアミノ酸配列の推定に基づき、新規物質であるヒトBNP誘導体を合成し、その薬理作用についてさらに検討を進めたところ、これらの物質が既知のナトリウム利尿ペプチドが有する平滑筋弛緩作用、ナトリウム利尿作用を有することを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、

X-Cys-Phe-Gly-Arg-Lys-Met-Asp-Arg-Ile-Ser-
Ser-Ser-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Lys-Val-Leu-Arg-
Arg-His-OH (I)

(式中、XはH、H-Gly-Ser-Gly-又はH-Ser-Pro-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly-を示す)

で表わされる生理活性ペプチドまたはその塩およ

びこれを含むする循環器系疾患治療剤を提供するものである。

本発明において、XがH-Gly-Ser-Gly-であるペプチド(I)をヒトBNP-26と称し、XがH-Ser-Pro-Lys-Met-Val-Gln-Gly-Ser-Gly-であるペプチド(I)をヒトBNP-32と称することがある。

なお、本明細書において、ペプチド中の略称は、当該分野において一般に使用されるものであり、次の意味を有する。

Asp : L-アスパラギン酸

Ser : L-セリン

Gly : グリシン

Cys : L-システイン

Phe : L-フェニルアラニン

Arg : L-アルギニン

Leu : L-ロイシン

Ile : L-イソロイシン

Asn : L-アスパラギン

Val : L-バリン

Tyr : L - チロシン

本発明のペプチド (I) は、ペプチド合成に常用される固相法又は液相法〔例えば、泉屋信夫ら著「ペプチド合成」1984年、丸善発行；日本化学会編「生化学実験講座 (I) / タンパク質の化学」4巻、208～495頁、1977年、東京化学同人発行等〕によって製造することができる。

例えば固相法によって本発明ペプチド (I) を合成する場合、使用するアミノ酸の α -アミノ基は9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基 (Fmoc基)、アスパラギン酸の β -カルボキシル基はtert-ブチル基 (tBu基)、アルギニンのグアニジノ基は4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル基 (Mtr基)、セリンの水酸基はtert-ブチル基 (tBu基)、システインのチオール基はアセトアミドメチル基 (Acm基)、ヒスチジンのイミダゾール基はトリチル基 (Trt基)、リジンの ϵ -アミノ基はtert-ブチルオキシカルボニル基 (Boc基) で保護することが好ま

しい。また、使用する不溶性樹脂は、p-アルコキシベンジルアルコール樹脂 (Wang Resin) が好ましい。保護アミノ酸の縮合はジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 法、1, 3-ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) による活性エステル法、DCC による酸無水物法、ジフェニルリン酸アジド法 (DPPA) 法等を用いるのが好ましい。しかし、アミノ酸の保護基は上記のものに、限定されるものではなく、例えば使用するアミノ酸の α -アミノ基は tert-ブチルオキシカルボニル基 (Boc 基) で保護してもよい。

固相法による本発明ペプチド (I) の製造は、例えば以下のようにして行なわれる。まず C 末端アミノ酸である His の保護誘導体 Fmoc-His(Trt)-OH を p-アルコキシベンジルアルコール樹脂に導入し、以後対応する保護アミノ酸を順次結合させ、保護ペプチド樹脂を合成する。次いで、ピペリジン及びトリフルオロ酢酸 (TFA) による処理、ピペリジン及びトリメチルシリルブロマイド (TMSBr) による処理 [Chem. Pharm. Bull., 35 (9), 3880

(1987)] 等により、樹脂からのペプチドの切断と Ac_m 基以外の保護基の除去を同時に行ない、システインのチオール基に Ac_m 基を有するペプチド [CYS(Ac_m)-ペプチド] を得る。次にこれをヨウ素で酸化することにより、チオールの保護基を脱離させると同時に、ペプチド分子内の 2 つのシステインのチオール基によるジスルフィド結合を形成させることにより、粗合成ペプチドを得る。

得られた粗合成ペプチドの精製は、常法、例えばゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等により行うことができる。

なお、本発明ペプチド (I) は、塩酸、硫酸、磷酸等の無機酸や蟻酸、酢酸、クエン酸、酒石酸、フマル酸、マレイン酸等の有機酸を用いて、常法に従って酸付加塩とすることができる。

〔作用及び発明の効果〕

斯くして得られる本発明ペプチドは平滑筋弛緩作用等を有する。これらの作用について検討した結果を次に示す。

< 平滑筋弛緩作用 >

① 試験方法

4 ～ 7 日 齢 の ヒ ヨ コ の 直 腸 を 摘 出 し 、 長 さ
1.5 cm の 筋 標 本 と し た 。 こ れ を 、 3 ml オ ル ガ ン
バ ス 中 、 9 5 % O_2 - 5 % CO_2 ガ ス を 通 じ 、 3 2
℃ に 保 温 し た ク レ ブ ス - ヘ ン ス レ イ ト 栄 養 液
〔 カ ル バ コ ー ル (2×10^{-8} M) を 含 む 〕 2.5
ml 中 に 浸 し た 。 こ の 筋 標 本 に 0.5 g の 静 圧 を か
け 、 約 3 0 分 静 置 し て 筋 の 自 動 運 動 が 安 定 し た
と ころ で 被 験 物 質 と し て ヒ ト BNP - 2 6 を 100
ng 投 与 し 、 投 与 後 6 ～ 8 分 間 の 筋 の 弛 緩 を 測 定
し た 。 測 定 後 す み や か に オ ル ガ ン バ ス を 洗 い 、
2 0 ～ 3 0 分 お い て 、 被 験 物 質 と し て ヒ ト BNP
- 3 2 を 2 0 0 ng 用 い て 上 記 操 作 を 繰 り 返 し た 。

被 験 物 質 は 所 定 量 を 生 理 食 塩 水 に 溶 解 し て 用 い
た 。

② 結果

結 果 を 第 1 - A 図 ～ 第 1 - B 図 に 示 す 。 そ の
結 果 、 本 発 明 ペ プ チ ド は 1 0 0 ～ 2 0 0 ng の 投
与 で 強 い 平 滑 筋 弛 緩 活 性 を 示 し た 。

以上の如く本発明ペプチド又はその塩は優れた平滑筋弛緩作用を有し、さらに利尿及びナトリウム利尿作用、血圧降下作用を有し、かつヒト由来であるため安全性が高く、例えば心臓性浮腫、腎臓性浮腫、肝性浮腫、肺浮腫、高血圧症、うっ血性心不全、急性及び慢性腎不全等の治療薬として有用である。

また投与方法は、ペプチド系医薬の投与に使用されている方法すなわち静脈注射、筋肉内注射、皮下注射により、あるいは舌下投与、鼻内投与、直腸投与により投与することが可能である。

またこのペプチドを危険な又は有害な副作用を生じさせることなく投与できる量は、 $0.5 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$ の範囲が好ましい。

〔実施例〕

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

- (1) ペプチドヒトBNP - 26 及びヒトBNP - 32
の合成：

① 保護ペプチド樹脂の合成

保護ペプチド樹脂の合成においては、各構成アミノ酸の α -アミノ基はすべて9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基 (Fmoc基) で保護し、活性な側鎖のうち、アスパラギン酸の β -カルボキシル基はtert-ブチル基 (tBu基) で、アルギニンのグアニジノ基は4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル基 (Mtr基) でセリンの水酸基はtert-ブチル基 (tBu基) で、システインのチオール基はアセトアミドメチル基 (Acm基) で、ヒスチジンのイミダゾール基はトリチル基 (Trt基) で、リジンの ϵ -アミノ基はtert-ブチルオキシカルボニル基 (BOC基) で保護した。また、樹脂としては、保護Hisを導入したp-アルコキシベンジルアルコール樹脂1.0 gを用いた。

保護アミノ酸の縮合にあたっては、樹脂に結合している保護ペプチドの末端のアミノ基の保護基であるFmoc基をピペリジンで室温下6分間処理することを2回繰り返す、ほぼ完全に除去した。つ

いでこの脱 Fmoc 化で遊離したアミノ基を目的のペプチドのアミノ酸配列における次に位置するアミノ酸の Fmoc 保護誘導体のカルボキシル基と縮合した。この保護アミノ酸の縮合においては、Fmoc-アミノ酸 1 mmol を 1-ヒドロキシベンズotリアゾールの存在下、1, 3-ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) と処理することにより縮合した。この操作によって反応が完結してしない場合は、同じ操作を繰り返した。なお、反応の進行及び完結はニンヒドリンによるカイザーテストでモニターした。

この様にして、Fmoc-Gly-Ser(tBu)-Gly-Cys(Acm)-Phe-Gly-Arg(Mtr)-Lys(Boc)-Met-Asp(tBu)-Arg(Mtr)-Ile-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Lys(Boc)-Val-Leu-Arg(Mtr)-Arg(Mtr)-His(Trt)-樹脂を合成した。この段階でこのものを一部取り出し、前述の方法に従って保護ペプチドの末端のアミノ基の保護基である Fmoc 基を除去し、H-Gly-Ser(tBu)-Gly-Cys(Acm)-Phe-Gly-Arg(Mtr)-Lys(Boc)-Met-Asp(tBu)

-Arg(Mtr)-Ile-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Lys(Boc)-Val-Leu-Arg(Mtr)-Arg(Mtr)-His(Trt)-樹脂(以下、保護ヒトBNP-26樹脂と言う)を670mg得た。

残りをさらにN端延長の反応にかけ、Fmoc-Ser(tBu)-Pro-Lys(Boc)-Met-Val-Gln-Gly-Ser(tBu)-Gly-Cys(Acm)-Phe-Gly-Arg(Mtr)-Lys(Boc)-Met-Asp(tBu)-Arg(Mtr)-Ile-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Lys(Boc)-Val-Leu-Arg(Mtr)-Arg(Mtr)-His(Trt)-樹脂を得た。次いで前述の方法に従って保護ペプチドの末端のアミノ基の保護基であるFmoc基を除去し、H-Ser(tBu)-Pro-Lys(Boc)-Met-Val-Gln-Gly-Ser(tBu)-Gly-Cys(Acm)-Phe-Gly-Arg(Mtr)-Lys(Boc)-Met-Asp(tBu)-Arg(Mtr)-Ile-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Leu-Gly-Cys(Acm)-Lys(Boc)-Val-Leu-Arg(Mtr)-Arg(Mtr)-His(Trt)-樹脂(以下保護ヒトBNP-32樹脂と言う)を1.5g得た。

② Cys(Acm)-ヒトBNP-26の合成

保護ヒトBNP - 26樹脂600 mgをチオアニソール2.4 mlと共に反応器中に入れ、トリフルオロ酢酸 (TFA) 20 ml、トリメチルシリルブロマイド (TMSBr) 2.6 ml 及びエタンジチオール2.4 mlを加え、0℃で3時間反応させた。反応終了後、エーテル200 mlで洗ってアニソールを除去し、1 N - 酢酸20 mlで生成物を抽出した。樹脂及び不溶物を遠心分離でとりのぞき、氷冷しながら1 M フッ化ナトリウム (NaF) 1 mlを加え、5%アンモニア水でユニバーサル試験紙上pH約8に調整して30分放置した。その後、再び1 N - 酢酸を加えてpH5に再調整し、更に水で10倍に希釈した。これを60 mlのODS樹脂 [LC-Sorb(ケムコ製)] を充填したカラム (φ3 cm × 8.5 cm) に吸着させ、0.1 N - 酢酸でよく洗浄した後、0.1% TFAを含む60%アセトニトリル200 mlで溶出した。アセトニトリルを減圧下留去後、凍結乾燥して300 mgの粗Cys(Acm)-ヒトBNP - 26を得た。

このものを1 N - 酢酸9 mlに溶かし、9回に分けて逆相HPLCにかけた [カラム:ヌクレオシル

しながら滴下し、20分間さらに攪拌した。その後、B液をヨウ素のかった色が消えるまで滴下した。このものに水500 mlを加えて希釈し、30 mlのODS樹脂〔LC-Sorb (ケムコ製)〕を充填したカラム(φ2×9.5 cm)に吸着させた。これを0.1 N-酢酸でよく洗浄した後、0.1 % TFAを含む60 % アセトニトリル60 mlで溶出した。アセトニトリルを減圧留去後、凍結乾燥し、粗ヒトBNP-26 60.0 mgを得た。このものを1 N-酢酸4 mlに溶かし、4回に分けて逆相HPLCにかけた〔カラム：ヌクレオシル120-5 C18, φ20×250 mm, 流速5 ml/分, 溶媒系; (A) 水：アセトニトリル：10 % TFA = 90 : 10 : 1, (B) 水：アセトニトリル：10 % TFA = 40 : 60 : 1, (A) : (B) = 90 : 10 から (A) : (B) = 55 : 45までの120分間の直線グラジエント〕。この操作を4回繰返し、62～66分のメインピークを分取した。この分画を、減圧下アセトニトリルを留去後、凍結乾燥して、25 mgのヒトBNP-26を得た。

④ Cys(Acm)- ヒト BNP - 3 2 の合成

保護ヒト BNP - 3 2 700 mg を前記 ② と同様に、チオアニソールと共に TFA , TMSBr 及びエタノールにより、樹脂からの脱離、脱保護を行ない、さらに逆相 HPLC による精製により Cys(Acm)- ヒト BNP - 3 2 を 60.0 mg 得た。

⑤ ヒト BNP - 3 2 の合成

Cys(Acm)- ヒト BNP - 3 2 60.0 mg を前記 ③ と同様に、ヨードによる脱 Acm 、環化を行ない、粗ヒト BNP - 3 2 20.0 mg を得た。次にこのものを 1 N - 酢酸 4 ml に溶かし、4 回に分けて逆相 HPLC にかけた〔カラム：ヌクレオシル 120 - 5 C18 , ϕ 20 × 250 mm , 流速 5 ml / 分 , 溶媒系 ; (A) 水 : アセトニトリル : 10 % TFA = 90 : 10 : 1 , (B) 水 : アセトニトリル : 10 % TFA = 40 : 60 : 1 , (A) : (B) = 90 : 10 から (A) : (B) = 55 : 45 までの 120 分間の直線グラジエント〕。この操作を 4 回繰り返し、61 ~ 64 分のメインピークを分取した。減圧下アセトニトリルを留去後、凍結乾燥

し、5 mg のヒトBNP - 32 を得た。

(2) 物理化学的性質

上記(1)において得られたヒトBNP - 26 及び
32 の物理化学的性質は、次の通りであった。

(a) 性状

白色粉末

(b) 溶媒に対する溶解性

水、酸性水溶液、酢酸に可溶。クロロホルム、
ベンゼン、エチルエーテル、ヘキサンに不溶。

(c) 酸性、中性、塩基性の別

塩基性

(d) アミノ酸組成

第1表の通り。

以下余白

4. 図面の簡単な説明

第1-A図はヒヨコ直腸標本に本発明のヒトBNP-26を100ng投与した時の弛緩長さの経時変化、第1-B図はヒヨコ直腸標本に本発明のヒトBNP-32を200ng投与した時の弛緩長さの経時変化を示す図面である。

以 上

出 願 人 第一化学薬品株式会社

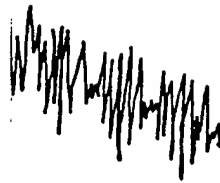
第一製薬株式会社

松 尾 壽 之

代 理 人 弁 理 士 有 賀 三 幸

弁 理 士 高 野 登 志 雄

弁 理 士 中 嶋 俊 夫



4 8

時間 (分)

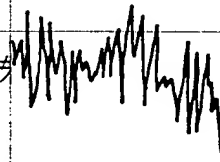
1-A 図

出願人 第一化学薬

第一製薬株式

松尾 清

代理人 弁理士 有



4 8

時間 (分)

第1-B 図

33

.....GCGCAGTCCCTCCAGA

Leu Ala Phe Leu Gly Arg Ser His Pro Leu Gl

[illegible]

... .. Val Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His

[illegible]

Ser Ser Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
.....
.....

[illegible]

ТІАТЛАСТ